第31卷 第2期 昆虫学报 Vol. 31, No. 2
1988 年 5 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1988

杂交蚕后代的5S rRNA一级结构

曹功杰 冯晓黎 祁国荣
（中国科学院上海生物化学研究所，上海）
罗恒成 钱惠田 谭秀玲 吴 伦 梁秀玲
（广西蚕业指导所）

摘要 本文用化学降解和核糖核酸酶降解凝胶电泳直读法，测定了广西蚕业指导所用人工授精方法获得的蓖麻蚕（*Philosamia cynthia ricini*, ♂）和家蚕（*Bombyx mori*, ♀）的杂交第六代个体（具有花斑）的5S rRNA的一级结构。以同法测定了其母本家蚕 5S rRNA 的一级结构。结果见到两者一样，说明杂交蚕的 5S rRNA 基因来自母本。它们的结构与 Komiya 等（1981）测定的未知品种家蚕 5S rRNA 有二个核苷酸的差别。

关键词 蚕 人工授精 杂交 5S rRNA

蓖麻蚕、柞蚕和家蚕是天然丝生产的三个主要蚕种，蓖麻蚕、柞蚕隶属于天蚕蛾科(Saturniidae)，家蚕隶属于家蚕蛾科（Bombycidae)。这三种蚕不仅在形态上，而且在染色体对数上都是不同的。因此，在自然情况下，异种间不能交配繁殖后代。但三种蚕都各具不同的优越性能，蓖麻蚕抗高温，龄期短；柞蚕丝质坚韧；家蚕丝质好，经济价值高。为了改变这些蚕的品质，广西蚕业指导所、广西农学院蚕桑系钱惠田等（1981）进行了异种间的人工授精试验，用注射针吸取精液注射到另一种处女蛾交配囊导管，结果家蚕与蓖麻蚕的精液互注，都获得成功；而蓖麻蚕与柞蚕的精液互注，催青卵都是畸形死胎，没能成功。

蓖麻蚕精液注入家蚕处女蛾，获得了强健好养抗高温的后代，直至第8代均未改变这一性状。如何解释这一结果有不同看法。有人认为这是异种精液刺激杂合体母蛾获得的孤雌生殖，卵核与极体结合所致。但孤雌生殖的后代，一般对外界抵抗力差，而现在第8代仍有抗高温这一性状，好象是蓖麻蚕抗高温这一性状已嫁接于家蚕上。此外，有些蚕还有蓖麻蚕的花斑。广西农学院蚕桑系又进行了血液酯酶同功酶试验，表明杂交后代兼有双亲的带，但个体差异较大。

5S rRNA 是基因表达的直接产物，并具有分子比较小，无修饰核苷，易于测定其一级结构等特点。另外，曹功杰等（1983）已经测定了白黄种蓖麻蚕 5S rRNA 的一级结构，与 Komiya 等（1981）所测定未说明品种的家蚕 5S rRNA 的一级结构相比，说明两者的 5S rRNA 是有差别的。为了从分子生物学水平了解人工授精这一杂交现象，本文报道杂交蚕和它的母本家蚕 5S rRNA 的核苷酸顺序，其结构是一样的，说明杂交蚕 5S rRNA 基因来自母本。

本文于1986年2月收到。

材料和方法

一、材料为蓖麻蚕(南一种,♂)和家蚕(757 种,♀)人工授精后的第六代杂交蚕,并选取体表有花斑的。另外取材为母本家蚕(757 种)。

二、5S rRNA 的制备,取上述二种蚕幼虫五龄末期后部丝腺体,按辜祥荣等(1981)的方法制备小分子 RNA,然后在含有 7M 尿素的 10% 聚丙烯酰胺平板凝胶中电泳以分离、制备 5S rRNA。

为了进行 5S rRNA 的 5′ 末端 ^{32}P 标记,还要将 5S rRNA 用磷酸单酯酶处理,以脱去 5′ 末端磷酸。脱磷后的 5S rRNA 再次用含 7M 尿素的 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化。

三、5S rRNA 5′ 末端 ^{32}P 标记以及核糖核酸酶部分降解凝胶直读顺序分析按照祁国荣等(1985)的方法进行。其中 T_4 多核苷酸激酶由中国科学院生物物理所生化试剂厂生产,RNase A 由中国科学院上海生化所东风试剂厂生产,RNase T_1 为 E. Merck 产品,RNase U_2 为 Sankyo 产品,RNase Phy M 为 P-L biochemicals 产品,γ-^{32}P-ATP 为 Amersham 产品。

四、5S rRNA 3′ 末端 ^{32}P 标记以及化学降解凝胶直读顺序分析按照 Peattie (1979) 的方法进行。其中 T_4 RNA 连接酶由中国科学院上海生化所生产,硫酸二甲酯、无水肼、苯胺等化学试剂系国产经实验室重蒸后使用。

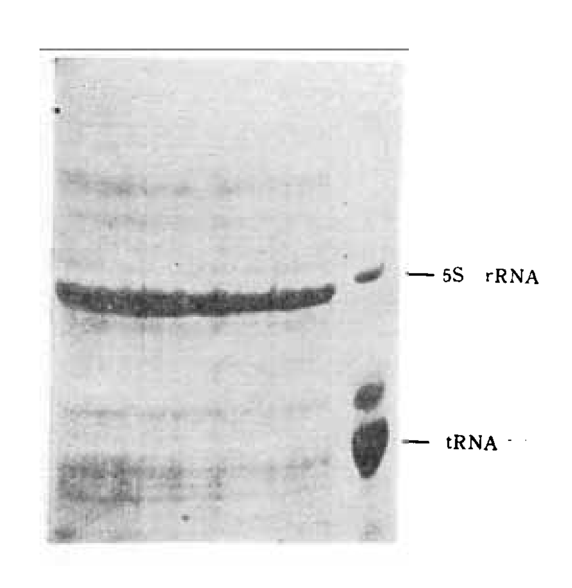


图 1 杂交蚕小分子 RNA 的分离(右侧为酵母小分子 RNA 作对照)

结果与讨论

一、杂交蚕后部丝腺体小分子 RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电离分离图谱见图 1。上面一条粗带为 5S rRNA,下面一些带为 tRNA。我们可以明显看出 5S rRNA 在小分子 RNA 中含量比较多,而 tRNA 含量相对比较少。这是由于我们所取的蚕处于五龄末期,丝心蛋白合成已经结束,tRNA 大量减少有关,这和辜祥荣等(1981)研究的蓖麻蚕不同龄期的 tRNA 含量变化是一致的。因此,如果要制备大量的 5S rRNA,取材以五龄末期为好,而要制备大量的 tRNA,则应该取材早一些,为五龄盛食期最好。家蚕(757)也有完全相同的情况。

二、杂交蚕后部丝腺体 5S rRNA 化学降解和核糖核酸酶降解凝胶电泳直

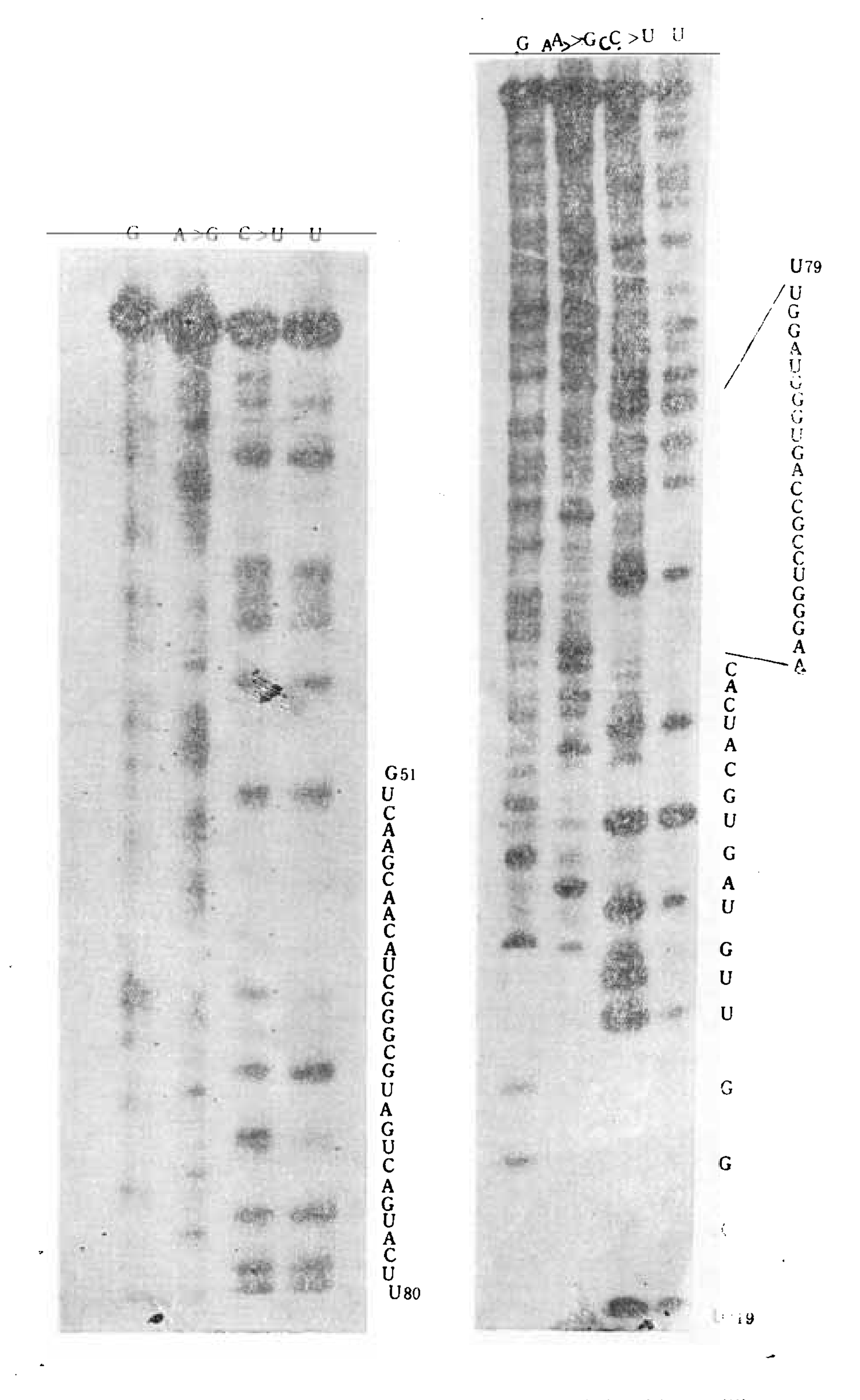


图 2　3′ 末端 ^{32}P 标记的杂交蚕 5S rRNA 化学降解凝胶直读放射自显影图谱

读顺序分析放射自显影图谱分别见图 2 和图 3。根据这些序列分析的结果，可知杂交蚕后部丝腺体 5S rRNA 有 120 个核苷酸，其一级结构如图 4 所示。用同样方法测定的家蚕 (757) 后部丝腺体 5S rRNA 与杂交蚕是一样的 (见图 4，图谱省略)。虽然，父本蓖麻

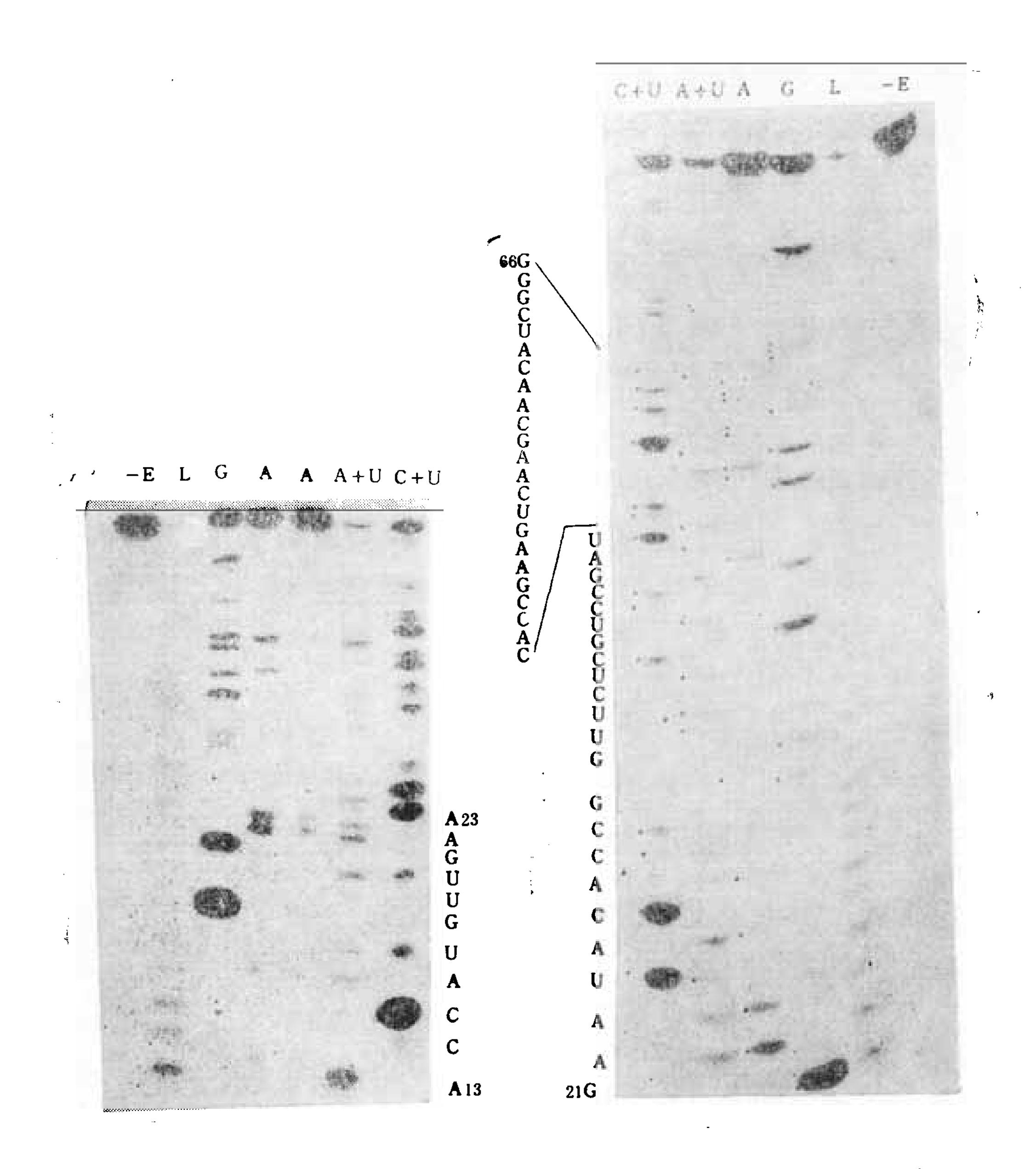


图 3 5′ 末端 ^{32}P 标记杂交蚕 5S rRNA 核糖核酸酶降解凝胶电泳直读放射自显影图谱

```
                10        20        30        40
杂交蚕      pGCCAACGUCCAUACCAUGUUGAAUACACCGGUUCUCGUCC
家蚕(757品种)  ----------------------------------------
家蚕(K)*     ----------------------------------------
蓖麻蚕(白黄)**  ----------------C------A----------------

                     50        60        70        80
             GAUCACCGAAGUCAAGCAACAUCGGGCGUAGUCAGUACUU
             ----------------------------------------
             -----------------------------G----------
             --------------------G-------CG----------

                     90       100       110       120
             GGAUGGGUGACCGCCUGGGAACACUACGUGAUGUUGGCUU OH
             ----------------------------------------
             ------------------------C---------------
             -----------------------CG-----U---------
```

图 4 几种蚕 5S rRNA 的核苷酸顺序

* 家蚕（K）为 Komiya 等（1981）测定，未注明品种

** 蓖麻蚕（白黄）为曹功杰等（1983）测定

```
                  AU                   U
                C    A            A  A  A         CU
   pGCCAACGUC          CC AUGUUG        C AC CGGU    C G
    |||||||||          || ||||||          || ||||       U
HO UUCGGUUGUAG       GG UACAAC        C UG  GCCA        C
              U — G    C       G  A A    AA    C  U A G C
              G — C
              C — G
              A — U
      105(C)  U — A(G)70
              C — G
            C A — U C
          A           A
                        G
           A           U
             G — C A
             G — U
             G — U
             U — G
             C — G
           C       A
             G — U
             C — G
             C — G
           A       G
             G   U
```

图 5 家蚕（757）后部丝腺体 5S rRNA 的二级结构

（括号内为 Komiya 等测定的家蚕 5S rRNA 的核苷酸残基）

蚕（南一种）5S rRNA 的一级结构没有测定，但是，白黄种蓖麻蚕 5S rRNA 的一级结构已经发表（曹功杰等，1983）。由于 5S rRNA 的保守性，南一种与白黄种蓖麻蚕 5S rRNA 之间即使有差异，也不会太大。因此，可以推断，杂交蚕 5S rRNA 相同于母本，而不同于父本，人工受精杂交蚕 5S rRNA 基因来自于母本。当然，这样的结果还不能解释本文开头提出的疑问，但无疑对进一步研究这一杂交现象是有益的。我们打算测定反杂交蚕（家蚕♂×蓖麻蚕♀）的 5S rRNA 顺序，以取得更多的信息。

三、从图 4 可以看到，757 种家蚕后部丝腺体 5S rRNA 与 Komiya 等 (1981) 测定的未知品种家蚕 5S rRNA 有二个核苷酸的差别。图 5 是根据 De Wechter 等 (1982) 提出的 5S rRNA 二级结构模型排列的 757 种家蚕（或杂交蚕）5S rRNA 的二级结构，并显示了与 Komiya 等测定的家蚕的差别位点，可见，它们之间不同的两个核苷酸在二级结构中是一对碱基。即 A-U 配对代替了 G-C 配对。

参 考 文 献

祁国荣等 1985 棉花种子 5S rRNA 的全核苷酸顺序。中山大学学报(自然科学版) **2**: 65—72。

钱惠田等 1981 蚕的人工授精(初报)。广西蚕业通讯 **4**: 50—5。

曹功杰等 1983 蓖麻蚕后部丝腺体 5S rRNA 的核苷酸顺序。生物化学与生物物理学报 **15**(5): 405—13。

覃祥荣等 1981 五龄蓖麻蚕后部丝腺体核酸及丝蛋白含量的变化。昆虫学报 **24**(4): 349—55。

De Wachter, R. et al. 1982 Conservation of secondary structure in 5S ribosomal RNA: a uniform model for eukaryotic, eubacterial, archaebacterial and organelle sequences is energetically favourable. *Biochimie*. **64**: 311—29.

Komiya, H. et al. 1981 Nucleotide sequence of 5S rRNA from the posterior silkglands of *Bombyx mori*. *J. Biochem*. **89**: 717—22.

Peattie, D. A. 1979 Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* USA **76**: 1760—4.

THE 5S rRNA NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A SILKWORM HYBRID

Cao Gong-jie Feng Xiao-li Qi Guo-rong

(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

Luo Heng-cheng Qian Hui-tian Tan Xiu-ling Wu Lun Liang Xiu-ling

(Guangxi Institute of Sericulture)

A silkworm hybrid (*Philosamia cynthia ricini* ♂ ×*Bombyx mori* ♀) was obtained by injecting semen of *Philosamia cynthia ricini* into the bursa copulatrix of female moth of *Bombyx mori* in Guangxi Institute of Sericuture in 1981. By means of rapid gel sequencing technique we have determined the complete nucleotide sequences of the 5S rRNA from the posterior silkglands of both the silkworm hybrid (6th generation) and its female parent. The results show that they have the same sequence. It seems that the 5S rRNA gene of the hybrid probably comes from the female parent. It has also been found out that there are two nucleotide differences between 5S rRNA of the *Bombyx mori* strain 757 and that of the unknown strain reported by Komiya et al. in 1981.

Key words silkworm——artificial fertilization——hybridization——5S rRNA